

## 海洋性発光細菌 *Vibrio fischeri* に感染する バクテリオファージの性状

日 高 富 男・小 林 真 澄

### Characterization of the Bacteriophages Infecting Marine Luminous Bacterium *Vibrio fischeri*

Tomio Hidaka\* and Masumi Kobayashi\*

*Keywords* : Luminous bacteria, Bacteriophages, *Vibrio fischeri*

#### Abstract

Twelve bacteriophages infecting marine luminous bacterium *Vibrio fischeri* have been isolated from seawater of Kagoshima Bay, at 9 times of selected seasonal intervals during 1980 to 1982. The lytic patterns, plaque morphology, particle structures, stabilities, one-step growth characteristics, and serological properties of them were observed. Each phage has a strict host specificity. The phages varied considerably in particle structure and size; the phage heads were polyhedral with tails varying in length between 10 and 135 nm. Three phages of them have a short tail, six have a long and noncontractile tail, and three have a tail of complex structure with a contractile sheath. They also differed from serologic reactions. They were stable phages with double-stranded DNA as genetic material. These phages may provide a rapid and sensitive means of differentiating *V. fischeri* strains. It seems that these data form a basis of the ecological studies of *V. fischeri*-phage systems in seawater.

発光細菌の大部分は海産種であり、海洋のあらゆる従属栄養細菌群に共通する性格を備え、常にそれらに含まれて検出される。海洋性発光細菌は *Photobacterium phosphoreum*, *P. mandapamensis*, *Lucibacterium harveyi* と *Vibrio fischeri* の3属4種に分類される(Bergey's Manual, 8版)<sup>1)</sup>。これら発光細菌に感染するバクテリオファージ(単にファージともいう)について、古く Spencer<sup>2)</sup> は北海の海水から7株のファージを分離し、そのうちの1株が *P. phosphoreum* に感染するものであると報告している。その後多くの研究者が海洋細菌に感染するファージの分離と性状を報告している<sup>3-5)</sup>。それらの報告は宿主細菌を菌属レベルで鑑別記載したものであり、*Vibrio*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* などの属菌に感染するものが多いことはわかるが、宿主細菌の菌種までは知られていない。近年 *V. parahaemolyticus*<sup>6-9)</sup> や *V. natriegens*<sup>10)</sup> など海洋から分離されるいくつかの菌種に感染するファージの報告が見ら

---

\* 鹿児島大学水産学部微生物学研究室 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Kagoshima University, 50-20 Shimoarata 4, Kagoshima, 890 Japan)

れるが、発光細菌種に対するファージについての報告は寡聞である。そこで、半閉鎖した内湾である鹿児島湾を調査海域とし、その海水中の従属栄養細菌とくに発光細菌とそれらに感染するファージを研究対象として数年間季節ごとに調査した。

その調査結果の概要を述べれば、鹿児島湾内海水中の発光細菌細胞数はほぼ2~30(平均5) cfu/mlであり、それは従属栄養細菌の2~20%に相当する菌数であり、晩春の頃に多く秋から冬にかけて少なかった。それら発光細菌の菌種組成は、季節によって大きく変動した。すなわち、冬から春にかけては *V. fischeri* が優占種であったが、夏から秋には *V. fischeri*, *P. mandapamensis*, *L. harveyi* の3者がほぼ同じ割合で検出された。そして、晩秋11月頃から *V. fischeri* の増加傾向が見られ、1月にはすでに *V. fischeri* が優占種となり、春と同じ菌種組成へと変動していく。このように菌種組成は、四季による変化を見せながら、ほぼ1年周期で変動していた。各菌種の出現挙動は、海水の温度変化に大きく依存しており、それはそれぞれの菌種の発育温度域とよく符号していた。また、分離発光細菌のうちファージ感受性菌の割合は7~100%(平均57%)であった。分離発光細菌をさらに菌種レベルでみれば、そのうち85%は *V. fischeri*, 10%は *L. harveyi*, 5%位は *P. mandapamensis* で、*P. phosphoreum* は検出できなかった。それぞれの菌種の中でファージ感受性菌の割合は *V. fischeri* で65%, *L. harveyi* で35%, *P. mandapamensis* で0%であった。発光細菌のうち *V. fischeri* は調査時期、場所を問わず万遍なく分布し、しかもファージ感受性菌株が多い。*L. harveyi*, *Photobacterium* spp. は散在し、しかも *L. harveyi* はファージ感受性菌の割合が低く、*Photobacterium* spp. ではそれを検出し得なかった<sup>11,12)</sup>。そのようにして発光細菌に感染する多数のファージを分離することができたが、本報においては *V. fischeri* に感染するファージについて、それらの特性をまとめて報告する。

## 実験材料および方法

### 供試微生物

*Vibrio fischeri* とそれに感染するファージは、1980年5月から'82年7月までの間に季節を異にする9回の鹿児島湾内調査に際して海水から分離された。その間に約100の *V. fischeri*-ファージ系が収集された。それらは宿主菌株-ファージ相互間の交差感染試験などにより鑑別、整理し、代表12系を選出して本研究に供試した。それらを *V. f.*-aφ~*V. f.*-lφ と符号し、本文中ではそれぞれを aφ~lφ と略称する。それら供試ファージ系の分離当初時期は aφ, bφ, cφ, dφ が'80年5月, eφ が'81年8月, fφ, gφ, hφ が'82年1月, iφ, jφ, kφ が'82年5月, lφ が'82年7月であった。なお供試細菌株やファージの検出、分離法は前報<sup>13)</sup>に記載した。

### 使用培地

供試菌の培養、保存やファージの分離、増強、保存に使用した培地は海水培地 (Sea Water Broth, SWB), 海水寒天培地 (Sea Water Agar, SWA), 軟海水寒天培地 (soft Sea Water Agar, sSWA), である。SWB の組成は、75%濃度の人工海水 (Herbst) 1 l にポリペプトン (大五) 5 g, 酵母エキス (大五) 1 g を溶解し、最終 pH が7.6~7.8になるように調整したものである。SWA, sSWA は SWB に粉末寒天をそれぞれ1.5%, 0.5%濃

度に加えて溶解し作成した。

#### ファージ定量法

試料ファージ液中のファージの定量は、Adams<sup>14)</sup>の記載に準じ、二重寒天平板法による溶菌斑形成単位 (plaque forming units, pfu) として滴定した。すなわち、予め SWB で適宜 $10^8$  希釈を行なったファージ液に感受性菌新鮮培養物 ( $10^8$  cells/ml) を等量混じ、 $25^{\circ}\text{C}$  に 5～10 分間放置して宿主細胞にファージ粒子を吸着させる。その吸着液 0.2 ml を予め溶解し  $45^{\circ}\text{C}$  に保温した sSWA 3 ml に注加し手早く混和した後、そのすべてを SWA 平板 (基層平板) 上に流込み重層する。重層寒天の固化するをまって  $25^{\circ}\text{C}$  にて 1 晩培養した。この方法で二重寒天平板上に形成された溶菌斑を計数し pfu/ml を算出した。

#### ファージの一段増殖実験法

標示菌を SWB で 1 晩培養したもの 0.5 ml を 4.5 ml の SWB に移植しさらに 2～3 時間振盪培養した。その新鮮培養物 ( $10^8$  cells/ml) 0.5 ml とファージ液 ( $10^6$  pfu/ml) 0.5 ml とを SWB 4 ml 中に加え混和し吸着管として  $25^{\circ}\text{C}$  で 20 分間培養した。その間にファージ粒子は宿主細胞に吸着する。20 分後その吸着管を SWB で 1/100 に希釈してファージの吸着を停止した後、それを増殖管として引き続いて培養した。増殖管からは所定時間毎に試料の一部を取り出し適宜希釈してファージ数を滴定し、放出ファージ数を算出した。別にファージ粒子の宿主細胞への吸着率を算出するため吸着 20 分後の吸着管における全ファージ数と未吸着ファージ数とを滴定した。すなわち吸着管を 1/100 に希釈した直後、その一部をとり感染中心体数を滴定して全ファージ数とし、また他の一部について、その中の未吸着ファージを分かつためにミリポアー (HA,  $0.45\ \mu\text{m}$ ) を通し、そのろ過液について遊離ファージ数を滴定した。こうして得られた吸着 20 分後の全ファージ数と遊離ファージ数との差を吸着ファージ数とし、その全ファージ数に対する百分率を吸着率とした。

#### ファージ濃縮法

ファージの濃縮法にはいろいろあるが本報では分別遠沈濃縮法を用いた。すなわち常法で増強調整されたファージ液を低温高速遠沈 ( $0^{\circ}\text{C}$ ,  $37,000\times g$ , 90 分間) し、分別したファージ粒子のペレットを少量の液に再懸濁した。懸濁のための液はそのファージの用途に応じて選択した。電顕標本作成に使う場合は 1% 酢酸アンモニウム水溶液に、免疫原として使う場合には 1/6 濃度人工海水に懸濁した。この方法でファージ濃度を 100 倍位に濃縮できた。

#### 電子顕微鏡観察

ファージ濃厚懸濁液 (1% 酢酸アンモニウム水溶液に対し  $10^{10-11}$  pfu/ml) を試料とし、リンタングステン酸による陰染色標本を作成した。すなわちファージ濃厚液を 2% リンタングステン酸水溶液 (KOH で pH 7.2 に調整) と等量混和し、それをコロジオン膜でおおって炭素蒸着したシートメッシュ上に滴下し、30～60 秒後残余の試料液をろ紙で適度に吸い取り乾燥させる。これを電子顕微鏡試料とし、日本電子製電子顕微鏡, JEM 100B 型に挿入し、電顕実拡大 60,000 倍で観察した。

#### 抗ファージ血清の作成

ファージ濃厚懸濁液 ( $10^{10-11}$  pfu/ml) を免疫原として実験動物ウサギに接種した。供試ウサギは生後 2 ケ月の雄で体重 1.8～2.0 kg 位のものであった。これらの下腹部皮下に、免疫原の 3 ml を接種した。注射は 3～4 日間隔で、11～12 回行なった。免疫が相当に進んだと思

われる時期に全採血を行なった。全採血は最後の免疫接種日から10～22日の間に行ない、ウサギ耳翼静脈よりできるだけ多く採血した。

採血した血液は大形遠沈管に採り、斜面にして室温に放置し凝血させ、血清と血餅に分離した。4時間ほどで血餅は収縮するが、この際スパーテルで血餅を切っておくと血清の収量は上がる。冷蔵庫（5℃）で1晩保持した後、分離した血清をさらに3000 rpm, 20分遠心分離し、上清を抗ファージ血清として試験管に分注した。この血清を56℃, 30分間加熱して非働化した。血清は非働化を行なうだけに止め、防腐剤は加えずに使用した。各供試ファージに対する抗ファージ血清について、本文中では抗 a $\phi$  血清を [a], 抗 b $\phi$  血清を [b]…と略称する。

抗血清による中和試験

抗ファージ血清にファージを加えて抗原抗体反応を行い、反応後の生残ファージ数を測定し、抗ファージ血清のファージ中和率を算出した。

中和試験は30℃で予温した抗ファージ血清0.9 ml にファージ液 (10<sup>7</sup> pfu/ml) を0.1 ml 加え混合した後、30℃で所定時間反応させた。所定時間後、反応液の0.1 ml を氷冷 SWB 9.9 ml に加えてすばやく攪はんし、中和反応を停止させた。この液について生残ファージ数を測定した。対照試験は中和反応系の中の抗ファージ血清に代えて SWB を加え、同様に行った。測定結果から中和率 (%) を算出した。

実験結果

1. 宿主特異性

供試 *V. fischeri*-ファージの宿主特異性を知るために、供試12系それぞれの宿主菌株とファージを相互に交差感染試験を行なった。その結果を Table 1 に示す。この結果、供試 *V. fischeri*-ファージ系はそれぞれ固有の宿主-ファージ系であって、他の系と相互に感染し

Table 1. Cross infectivity of test phages against *V. fischeri* strains.

Host	<i>Vibrio fischeri</i> -strains											
<i>V.f</i> -phages	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
<i>Vf</i> - a $\phi$	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
- b $\phi$	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
- c $\phi$	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
- d $\phi$	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
- e $\phi$	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
- f $\phi$	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
- g $\phi$	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
- h $\phi$	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
- i $\phi$	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
- j $\phi$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
- k $\phi$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
- l $\phi$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+

+ : Infective      — : Non-infective

あうことはなかった。このように各供試ファージ系は宿主特異性の厳しい系であることがわかった。

## 2. 溶菌斑形態

供試 *V. fischeri*-ファージはそれぞれの指示宿主菌株に対して、二重寒天平板上において、Fig. 1 に示すような溶菌斑形態を現わした。それらの溶菌斑は中、小の透明なもの、あるいはその周辺にハローが見られるものなどさまざまであった。それらの大きさは Table 2 に示すように直径 2～6 mm と観察し易いものであった。

Table 2. Some characters of the test *V. fischeri*-phage systems.

Phage	Phage particle Struc- ture <sup>*1</sup>	Size(nm) <sup>*2</sup>		Plaque Form <sup>*3</sup>	Size (mm)	One step growth <sup>*4</sup>			Survival(%)	
		Head	Tail <sup>*2</sup> W L			L.p. (min)	R.p. (min)	B.s.	to heat (50℃ 30min)	to treatment of chloroform
<i>V.f.</i> -aφ	Ⅲ	70	10×15	C	2	18	12	170	0.1	100
-cφ		60	7×10	CH	6	33	17	80	100	100
-eφ		70	10×20	C	3	52	10	120	100	100
<i>V.f.</i> -dφ	Ⅳ	65	7×100	C	2	30	26	17	50	100
-kφ		65	7×135	C	4	28	12	55	100	100
-lφ		65	7×110	C	2	32	25	80	100	100
<i>V.f.</i> -bφ	Ⅳ'	70	10×125	C	4	40	25	40	700	100
-iφ		70	10×135	C	2	28	14	23	300	100
-jφ		65	7×135	CH	4	30	12	18	100	100
<i>V.f.</i> -fφ	Ⅴ	85	20×125	CH	4	35	25	64	100	3
-gφ		80	15×110	C	2	—	—	—	100	3
-hφ		85	15×110	CH	5	40	30	6	100	100

\*1: Phage structural grouping by Tikhonenko<sup>15)</sup>

Ⅲ, Phages with a short tail.

Ⅳ, Phages with a long and noncontractile tail.

Ⅳ', Phages with a long and noncontractile tail with cross-bar structures.

Ⅴ, Phages with a tail of complex structure with a contractile sheath.

\*2: W, width; L, length.

\*3: C, clear; CH, clear with halo.

\*4: L.p., latent period; R.p., rise period; B.s., burst size.

## 3. ファージ粒子構造

供試 *V. fischeri*-ファージの粒子構造を Fig. 2 に示す。Tikhonenko<sup>15)</sup> は Bradley<sup>16)</sup> の分類に基礎をおいてファージを粒子構造からⅠ～Ⅴの5群に区別している。それらのⅠ群は繊維状のファージ、Ⅱ群は尾部類似のものをもつファージ、Ⅲ群は短い尾部をもつファージ、Ⅳ群は長く非収縮性の尾部をもつファージ、Ⅴ群は収縮性尾鞘をつけた完全な形をした尾部をもつファージ、である。供試ファージはそれぞれⅢ、Ⅳ、Ⅴ群のいずれかに類する構造を示している。そのうちⅣ群に属するものの中には尾部にクロスバー構造をもつものが含まれ、それらをⅣ'群と仮称する。Fig. 2 に見られるように aφ, cφ, eφ はⅢ群に、dφ, k

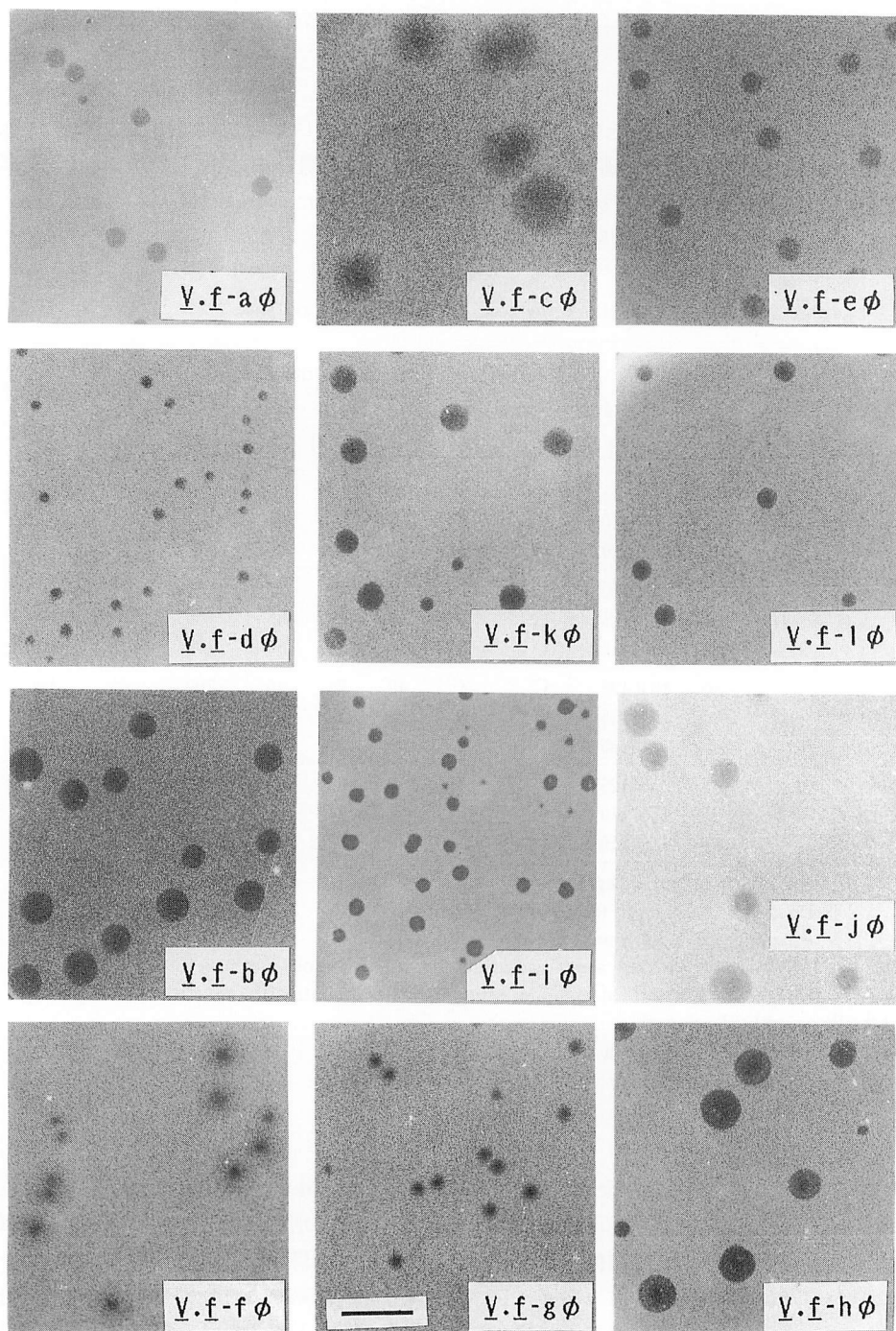


Fig. 1. Plaque morphology of *Vibrio fischeri*-phages.  
Bar=10mm

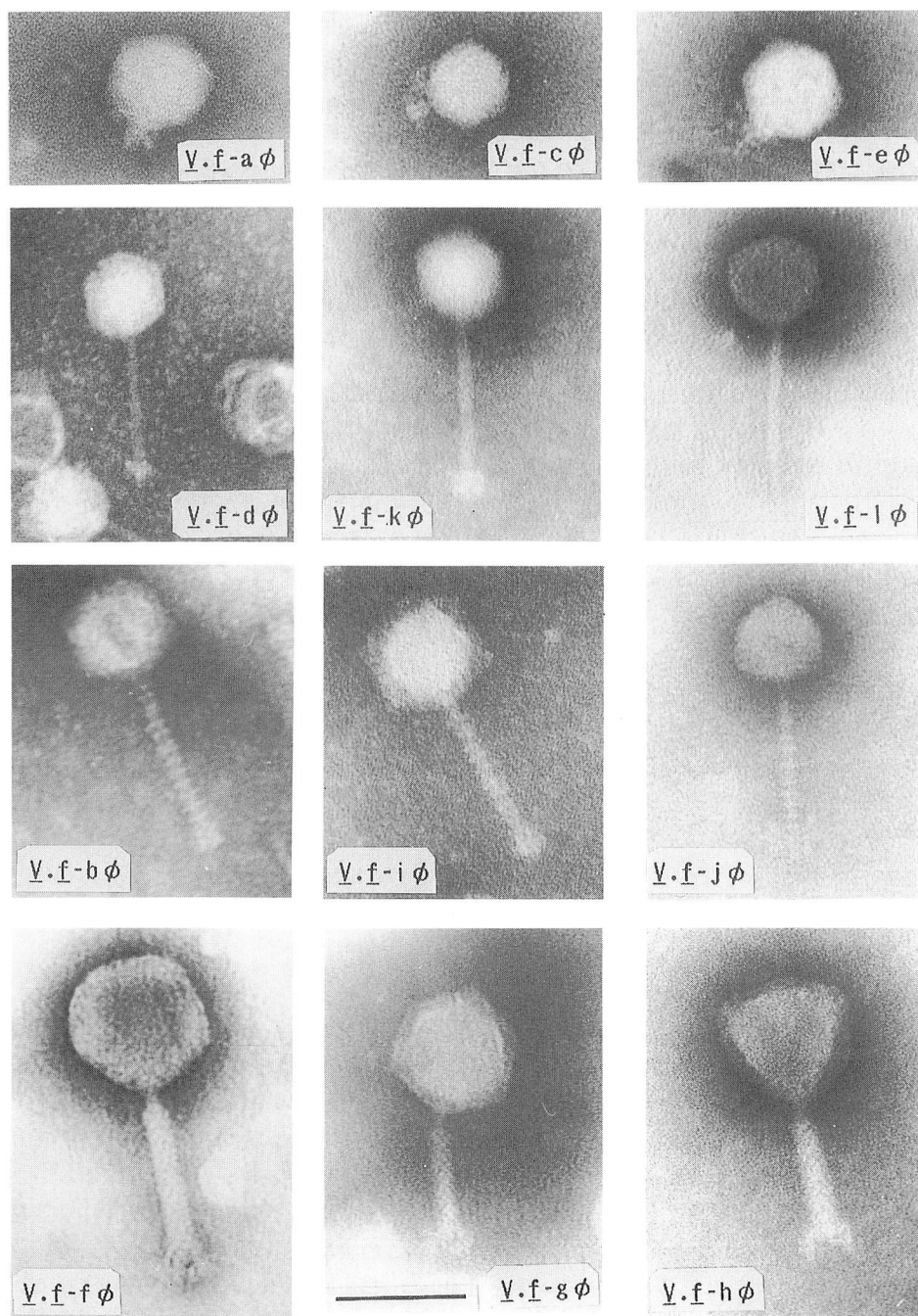


Fig. 2. Electron micrographs of *Vibrio fischeri*-phages particles negatively stained with phosphotungstic acid.  
Bar=100nm

$\phi$ ,  $l\phi$  はⅣ群に,  $b\phi$ ,  $i\phi$ ,  $j\phi$  はⅣ'群に,  $f\phi$ ,  $g\phi$ ,  $h\phi$  はⅤ群に属する粒子構造を備えていた。

前項で述べた溶菌斑と本項でのファージ粒子構造の形状, 大きさ, および以後に述べるいくつかの性状をとりまとめて Table 2 に示している。この表中でのファージの順序は粒子構造別に列記した。Fig. 2 に見られるように, 供試ファージの頭部はいずれも外観六角形で類似しており, その大きさは Table 2 に見られるようにⅢ, Ⅳ, Ⅳ'群に属するものが60~70 nm で, Ⅴ群に属するものは80~85 nm とやや大きかった。前述のように尾部構造は各群により異なっており, それにつれて尾部の大きさも Table 2 に示されるように大きく異なっていた。

#### 4. 一段増殖特性

供試ファージが宿主細胞内でどのような増殖過程をたどるかを知らるために各 *V. fischeri*-ファージ系について一段増殖実験を行なった。その結果得られた一段増殖曲線から潜伏期, 上昇期, 平均放出量を算出して Table 2 に示す。

これらの結果から一般的に潜伏期, 上昇期が短いものほど放出量が多いことがうかがえるが, それに類するものは  $a\phi$ ,  $c\phi$ ,  $e\phi$  で粒子構造がⅢ群に属するものであった。それらの放出量は80~170位であった。その他のファージについて特記すべき差異は見出されず放出量は80以下と低かった。とくに  $h\phi$  は潜伏期40分, 上昇期30分, そして放出量がわずかに6と小さく増強しにくいファージであった。

#### 5. 安定性

供試ファージを SWB に懸濁した状態で50℃, 30分間加熱処理あるいはファージ懸濁液にクロロホルムを飽和して2時間処理するなどして生残ファージ数を測定し, それら条件下でのファージの安定性を比較検討した。処理後の生残率(%)を Table 2 に示す。Table 2 に示されるように供試ファージの中には  $a\phi$ ,  $d\phi$  のように加熱処理によってある程度失活するものや逆に  $b\phi$ ,  $i\phi$  のように加熱処理によって滴定値が上るもの, また  $g\phi$  のようにクロロホルム処理によってやや失活するものなどが見られた。しかし一般的にはこれら両処理に対しては安定なものが多かった。

#### 6. 抗ファージ血清による中和反応

供試ファージ12株のそれぞれを免疫原として実験動物ウサギに注射し, 抗ファージ血清を作成した。まずそれら抗ファージ血清の抗原ファージに対する, 中和反応条件と中和率(%)を測定しその結果を Table 3 に示す。反応当初のファージ数 $10^6$  pfu/ml, 反応温度30℃の条件において各供試ファージは表中に記載の抗血清希釈率, 反応時間(分)において中和率90~99%となる条件であった。

次に, 各供試ファージとそれらに対応する各抗ファージ血清との相互間の交差中和実験を, Table 3 で確かめられた中和反応条件で行なった。この実験は供試ファージ相互の類縁性を血清学的に調べたものである。その結果を Table 4 に示す。その表中に見られるように, 各供試ファージとその抗ファージ血清との間の中和反応は90%以上の中和率を示していたが, その条件下で他のファージ・抗血清相互間においては若干の交差中和反応が認められたに過ぎない。それについて, まずファージ粒子構造Ⅳ群中の  $d\phi$ ,  $k\phi$ ,  $l\phi$  とそれぞれの抗ファージ血清[d], [k], [l]との相互間の交差中和反応の様相を詳細に見てみよう。 $d\phi$  は[k], [l]



Table 3. Rate of neutralization with antiphage-serum to homologous *V. fischeri*-phage.

<i>V.f</i> phage	Antiphage-serum	Condition of neutralization test				Rate of neutral (%)
		$\phi$ titer* (pfu/ml)	Serum-diln.	Temp. (°C)	Time (min)	
<i>V.f</i> -a $\phi$	[a]	10 <sup>6</sup>	1/512	30	5	92
-c $\phi$	[c]	10 <sup>6</sup>	1/512	30	10	99
-e $\phi$	[e]	10 <sup>6</sup>	1/512	30	5	90
<i>V.f</i> -d $\phi$	[d]	10 <sup>6</sup>	1/512	30	10	90
-k $\phi$	[k]	10 <sup>6</sup>	1/4096	30	5	99
-l $\phi$	[l]	10 <sup>6</sup>	1/512	30	5	93
<i>V.f</i> -b $\phi$	[b]	10 <sup>6</sup>	1/512	30	10	97
-i $\phi$	[i]	10 <sup>6</sup>	1/1024	30	10	98
-j $\phi$	[j]	10 <sup>6</sup>	1/512	30	20	91
<i>V.f</i> -f $\phi$	[f]	10 <sup>6</sup>	1/64	30	5	97
-g $\phi$	[g]	10 <sup>6</sup>	1/64	30	5	93
-h $\phi$	[h]	10 <sup>6</sup>	1/256	30	5	97

\*  $\phi$  titer = phage titerTable 4. Cross neutralization rates(%) between *V. fischeri*-phages and the antiphage-sera

<i>V.f</i> -phages		Antiphage-sera											
Structure*	No.	[a]	[c]	[e]	[d]	[k]	[l]	[b]	[i]	[j]	[f]	[g]	[h]
III	<i>V.f</i> -a $\phi$	92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-c $\phi$	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-e $\phi$	0	0	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IV	<i>V.f</i> -d $\phi$	0	0	0	90	12	18	19	16	0	0	0	0
	-k $\phi$	0	0	0	17	99	0	27	0	0	0	0	0
	-l $\phi$	0	0	0	15	0	93	0	0	0	0	0	0
IV'	<i>V.f</i> -b $\phi$	0	0	0	31	35	0	97	49	10	0	0	0
	-i $\phi$	0	0	0	28	0	0	29	98	32	0	0	0
	-j $\phi$	0	0	0	0	0	0	17	8	91	0	0	0
V	<i>V.f</i> -f $\phi$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97	0	0
	-g $\phi$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	93	0
	-h $\phi$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97

\*: See the key of Table 2.

で若干中和され、逆に[d]はk $\phi$ とl $\phi$ を少し中和している。しかしk $\phi$ -[k]とl $\phi$ -[l]の相互間には交差中和反応は見られない。このように交差中和率はファージ-抗血清相互間で違いが見られた。これに類する交差中和反応はファージ粒子構造IV'群のb $\phi$ , i $\phi$ , j $\phi$ と、それらの抗血清[b], [i], [j]の相互間にも見られている。その中でb $\phi$ -[b]とi $\phi$ -[i]の相互間の交差中和率は高く両ファージが血清学的により近縁であるといえる。ファージ粒子構造IV群とIV'群の間ではそれら両群をまたがった交差中和反応が見かけられ、両群は粒子

構造上もまた血清学的にも近似していることが知られた。ファージ粒子構造Ⅲ群とⅤ群の中のファージ-抗血清相互間には交差中和反応は見られなかった。またファージ粒子構造が異なるⅢ, Ⅳ, Ⅴ群間では相互間の交差中和反応はなかった。

## 考 察

本報で供試した *V. fischeri*-ファージ系は鹿児島湾内海水中から分離されたものである。長期間の調査における多数の分離ファージ系はそれらを相互に交差感染試験を行ない、宿主細菌株-ファージ系の類縁性を比較検討しながら整理して群別した。各群の代表ファージ系として、それぞれの群の宿主細菌株だけに感染能をもつ12ファージ系が選出、供試された。

供試ファージは一般に安定であり、50℃, 30分間の加熱あるいはクロロホルム処理などによって何らかの失活がみられるものは数株に過ぎなかった。クロロホルム処理によって損傷をうけるものはファージ粒子構造Ⅴ群の  $f\phi$ ,  $g\phi$  であり、そのことと粒子構造との関連がうかがえる。また加熱処理によってファージ液の活性が増加するものが見られた。それはファージ粒子構造Ⅳ'群に属する  $b\phi$ ,  $i\phi$  であり、尾部にクロスバー構造をもつものであった。このことは、それらのファージが懸濁液中でいくつかのファージ粒子が密集状態にあり、それが加熱処理によって離散したことによるものであろう。

供試ファージの粒子構造は Tikhonenko<sup>15)</sup> の群別Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ群に属するものであった。Ⅳ群に属するものは尾部にクロスバー構造をもつものとそうでないものがあり、それらを区別し、クロスバーをもつものを仮にⅣ'群として取扱った。これらⅢ, Ⅳ, Ⅳ', Ⅴの4群にはそれぞれ同数の3ファージ株ずつが属しており、粒子構造的には均一に分散していた。粒子構造Ⅳ群とⅣ'群はあえて区別したが、その間には血清学的に見て部分的な交差中和反応を示すものが多かった。これはそれらのファージがもつ抗原のなかに共通抗原があることを物語っている。ところで抗ファージ血清による中和反応に係わる抗体はファージの尾部に対するものであることが知られている。従って尾部構造の細かな差異が抗血清による中和反応の中和率に反映しているのであろう。これらファージの尾部構造、特に末端構造と抗血清による交差中和反応との関連については相互にさらに詳細な比較検討が必要であるが、提示の電顕写真は細部が不鮮明で尾部末端構造の違いはとらえ得なかった。一方、粒子構造Ⅲ, Ⅳ, Ⅴの各群は血清学的にも鮮明に区別しうるものであることがわかった。よってⅣ群とⅣ'群との関係は他の群との関係よりもより近縁であり、あえて区別するまでもないと考えられる。供試ファージは粒子構造Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ群に属するので、そのことからそれらの遺伝物質(核酸)は2本鎖のDNAであることが考えられる。それを確認するため Bradley<sup>17)</sup> の蛍光染色法でファージ核酸を検査したところ2本鎖DNAであることがわかった。

かくて *V. fischeri* に感染するファージ12株の性状と相互の類縁性を明らかにし得た。供試ファージ系は1980年5月から1982年7月までに分離されたものの中から選出された12系であるがそれら宿主細菌株-ファージそれぞれが鹿児島湾内海域でどのような出現パターンであったかは別報<sup>12)</sup> で述べた。さらに供試ファージの宿主特異性きびしい感染性は *V. fischeri* の菌株レベルでの鑑別を容易にするのに役立つであろう。そしてこのような性状の把握と類縁性の認識は今後それらの生態学的研究の基盤となりうる。

## 要 約

鹿児島湾内海水中から、'80年5月から'82年7月までに分離された多数の *V. fischeri*-ファージ系を整理し、代表12系についてウィルス学的諸性状と血清学的性状を検討した。供試 *V. fischeri*-ファージの12系はそれぞれ宿主特異性のきびしい固有のファージ系であった。それらは数株を除き、加熱あるいはクロロホルム処理に対して安定であり、溶菌斑形態、一段増殖曲線も再現性が高かった。供試ファージの粒子構造は Tikhonenko<sup>15)</sup> の群別、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ群にそれぞれ3、6、3株が属し、遺伝物質として2本鎖DNAをもつものであった。抗ファージ血清による中和反応から見た血清学的性状は粒子構造Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ群の間に類縁性は全く見られなかった。またⅢ群、Ⅴ群内の各所属ファージ間においても血清学的類縁はなかったが、Ⅳ群内の各所属ファージ間には相互に部分交差中和反応を示すものが含まれた。

供試 *V. fischeri*-ファージの宿主特異性きびしい感染性は *V. fischeri* の菌株レベルでの鑑別を容易にするに役立つであろう。そしてこのような性状の把握と類縁性の認識は今後それらの生態学的な研究の基盤となりうる。

## 謝 辞

本報中の、抗ファージ血清作成実験は、当時の卒論学生有村澄広、生野博両君の協力によって成されたものである。記して心からの謝意を表する。

## 文 献

- 1) R. E. Buchanan and N. E. Gibbons(ed)(1974): "Bergey's manual of determinative bacteriology", 8th ed. pp. 340-352, The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 2) R. Spencer (1963): Bacterial virus in the sea. in "Symposium on Marine Microbiology" (ed. by C. H. Oppenheimer), 350-365, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
- 3) W. J. Wiebe and J. Liston (1968): Isolation and characterization of marine bacteriophage. *Marine Biol.*, **1**, 244-249.
- 4) T. Hidaka (1971): Isolation of marine bacteriophages from sea water. *Bull. Jap. Soc. Fish.*, **37**, 1199-1206.
- 5) K. Moebus and H. Nattkemper (1981): Bacteriophage sensitivity patterns among bacteria isolated from marine waters. *Helgolander Meeresuntersuchungen.*, **34**, 375-385.
- 6) H. Nakanishi, Y. Iida, K. Maeshima, and T. Teramoto (1966): Isolation and properties of bacteriophages in *Vibrio parahaemolyticus*. *Biken's J.*, **9**, 149-157.
- 7) S. S. Sklarow, R. R. Colwell, G. B. Chapman, and S. F. Zane (1973): Characteristics of a *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage isolated from Atlantic coast sediment. *Can. J. Microbiol.*, **19**, 1519-1520.
- 8) T. Hidaka and A. Tokushige (1978): Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages in sea water. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, **27**, 79-90.
- 9) T. Koga, S. Toyoshima, and T. Kawata (1982): Morphological varieties and host ranges of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages isolated from seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 446-470.
- 10) A. Zachary (1976): Physiology and ecology of bacteriophage of the marine bacterium *Benecke*

*natriegens*: Salinity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 415-422.

- 11) 日高富男 (1983): 鹿児島湾における発光細菌分布の季節変動. 沿岸海洋研究ノート, **21**, 19-28.
- 12) 日高富男 (1988): 海洋細菌-ファージ系の生態. 海洋科学, **20**, 112-117.
- 13) 日高富男・上野有史・河部尚禎 (1987): 鹿児島湾内海水中のファージ感受性細菌について. 鹿大水紀要, **36**, 17-25.
- 14) M. A. Adams (1959): "Bacteriophages", Interscience Publishers, Inc., New York.
- 15) A. S. Tikhonenko (1970): "Ultrastructure of Bacterial Viruses" (translated from Russian by B. Haigh), pp. 29-32, Plenum-Press, New York.
- 16) D. E. Bradley (1967): Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacterial Rev.*, **31**, 230-314.
- 17) D. E. Bradley (1966): The fluorescent staining of bacteriophage nucleic acids. *J. Gen. Microbiol.*, **44**, 383-391.